



AMINO ACID AMIDE HYDROLASE AND USE THEREOF**Publication number:** JP2234678 (A)**Publication date:** 1990-09-17**Inventor(s):** ASANO YASUHISA; NAKAZAWA AKIKO; HANAMOTO SAWAKO;
KONDO SEI**Applicant(s):** SAGAMI CHEM RES**Classification:**

- international: C12P13/04; C12N1/20; C12N9/80; C12P13/22; C12P41/00;
C12R1/025; C12N1/20; C12N9/78; C12P13/00; C12P41/00;
(IPC1-7): C12N1/20; C12N9/80; C12P13/04; C12P13/22;
C12P41/00

- European:**Application number:** JP19890054995 19890309**Priority number(s):** JP19890054995 19890309**Also published as:** JP8022228 (B) JP2113384 (C)**Abstract of JP 2234678 (A)**

PURPOSE: To obtain a new D-amino acid amide hydrolase having substrate specificity and specific molecular weight from a culture mixture by culturing a bacterium belonging to the genus *Achromobacter*, capable of hydrolyzing amino acid amide to give the culture mixture. **CONSTITUTION:** A bacterium [e.g. new strain, *Achromobacter* sp. SCRC-SV3 (FERM P-1060)], capable of hydrolyzing amino acid amide, is cultured. In the culture, preferably a liquid medium containing a nitrogen source such as ammonium sulfate, a carbon source such as starch and an inorganic salt such as K₂HPO₄ or NaCl is used as the medium. The bacterium is cultured under an aerobic condition by shaking culture, aerated spinner culture, etc. The culture temperature is preferably 25-45 deg.C and pH is 5-11.; A D-amino acid amide hydrolase is collected from the prepared culture mixture and purified by using ordinary enzyme purification method. The enzyme is treated with D-amino acid amide or a D-amino acid amide-containing substance to form a D-amino acid.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-234678

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)9月17日

C 12 N 9/80
C 12 P 13/04
13/22
41/00

Z 7823-4B
8931-4B
C 8931-4B
A 7823-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全10頁)

⑮ 発明の名称 アミノ酸アミド加水分解酵素及びその使用

⑯ 特 願 平1-54995

⑰ 出 願 平1(1989)3月9日

⑱ 発 明 者 浅 野 泰 久 神奈川県相模原市南台1-9-2-202
⑱ 発 明 者 仲 沢 章 子 神奈川県相模原市東大沼4-4-1
⑱ 発 明 者 花 本 佐 和 子 神奈川県相模原市栄町3-16-204
⑱ 発 明 者 近 藤 聖 神奈川県大和市中央林間5-16-4
⑲ 出 願 人 財団法人相模中央化学 東京都千代田区丸の内1丁目4番5号
研究所
⑳ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

アミノ酸アミド加水分解酵素及びその使用

2. 特許請求の範囲

1. 下記の物性:

(イ) D-フェニルアラニンアミド及び水から
D-フェニルアラニン及びアンモニアを生成する
反応を触媒する;

(ロ) 高速液体クロマトグラフィーゲル濾過法
において約38,000の分子量を有する; 及び

(ハ) D体の芳香族アミノ酸アミドを良好な基
質とする;

を有するアミノ酸アミド加水分解酵素。

2. 請求項1記載のアミノ酸アミド加水分解酵
素の製造方法において、該アミノ酸アミド加水
分解酵素を生産することができるアクロモバク
ター(*Achromobacter*) 属細菌を培養し、この培養物
から該アミノ酸アミド加水分解酵素を採取する
ことを特徴とする方法。

3. 請求項1記載のアミノ酸アミド加水分解酵

素を生産することができるアクロモバクターsp.
SCRC-SV3。

4. アクロモバクター属細菌の培養物、菌体又
は、菌体処理物をD-アミノ酸アミドまたはD-
アミノ酸アミド含有物に作用させ、D-アミノ
酸を生成せしめることを特徴とするD-アミノ酸
の製造方法。

5. 請求項1記載のアミノ酸アミド加水分解酵
素をD-アミノ酸アミドまたはD-アミノ酸アミ
ド含有物に作用させ、D-アミノ酸を生成せしめ
ることを特徴とするD-アミノ酸の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

この発明は、新規なアミノ酸アミド加水分解酵
素、その製造方法、該酵素を生産する微生物、及
び該酵素を使用するD-アミノ酸の製造法に関す
る。D-アミノ酸は、医薬、農薬、食品の合成原
料として有用である。

〔従来の技術〕

アミノ酸アミド加水分解酵素は、通常、L-アミノ酸アミドに作用してL-アミノ酸を遊離する。ロビンソンら(*Journal of Biological Chemistry*, 202, 1 (1953))、ホプスら(*Archives of Biochemistry and Biophysics*, 114, 567-575 (1966))、ミナミウラら(*Journal of Fermentation Technology*, 33, 653 (1969))、ブランスコットら(*Journal of Biochemistry*, 75, 185 (1974))は、各種生物由来のアミノペプチダーゼが、L-アミノ酸からなるペプチドに作用するのみならず、D-アミノ酸をN末端とするペプチドに対してもわずかに作用することを報告しているが、これらは、D-アミノ酸からなるペプチドにのみ特異的に作用するアミノ酸アミド加水分解酵素ではない。

マエストラッチら(*Archives für Microbiology*, 138, 315 (1984))は、*Brevibacterium* 属細菌の産生するアシルアミド・アミドヒドロラーゼ(EC 3.5.1.4)が直鎖あるいは芳香族カルボン酸アミドのみならずD-アラニンアミ

ドにも作用することを報告しているがD-立体特異的な加水分解については全く記載されていない。又、本酵素はアミノ酸アミド加水分解酵素ではない。

特開昭57-13000、特開昭59-15978、特開昭60-36446、特開昭62-55097、及び特開昭62-253397には、各種微生物によるD-L-アミノ酸アミド又は、L-アミノ酸アミドの、対応するL-アミノ酸への酵素的加水分解法が記載されているが、酵素化学の見地から、いかなる酵素が関与しているのかについて記載されていない。又、D-アミノ酸アミド含有物のD-立体特異的な加水分解については全く記載されていない。

特開昭60-184392にはアクロモバクター(*Achromobacter*) 属、アルカリゲネス(*Alcaligenes*) 属、及びクルチア(*Kurtzia*) 属細菌菌体によるD-アミノ酸アミドの、対応するD-アミノ酸への酵素的加水分解法が記載されているが、酵素化学の見地から、いかなる酵素が関与しているのかについて記載されていない。又、記載されている加水分

(3)

解反応はD-アミノ酸アミドを原料とするものであり、D-アミノ酸アミド含有物のD-立体特異的な加水分解については確認されていない。

特開昭61-96989にはロドコッカス・エリスロポリス(*Rhodococcus erythropolis*) 菌体によるD-アミノ酸アミドの、対応するD-アミノ酸への酵素的加水分解法が記載されているが、酵素化学の見地から、いかなる酵素が関与しているのかについて記載されていない。又、D-アミノ酸アミド含有物のD-立体特異的な加水分解については全く記載されていない。

特開昭61-274690には、シュードモナス(*Pseudomonas*) 属、ロドコッカス(*Rhodococcus*) 属、及びセラチア(*Serratia*) 属細菌菌体によるD-アミノ酸アミドの、対応するD-アミノ酸への酵素的加水分解法が記載されているが、酵素化学の見地からいかなる酵素が関与しているのかについて記載されていない。又、記載されている加水分解反応はD-アミノ酸アミドを原料とするものであり、D-アミノ酸アミド含有物のD-立体特異的な

(5)

(4)

加水分解については全く記載されていない。

特開昭63-87998、および銅谷ら、昭和63年度日本醸酵工学会大会講演要旨集P 34には、ロドコッカス(*Rhodococcus*) 属細菌菌体によるD-L-アミノ酸アミドの、対応するD-アミノ酸への酵素的加水分解法が記載されているが、酵素化学の見地からいかなる酵素が関与しているのかについて記載されていない。又、記載されている加水分解反応はアクロモバクター(*Achromobacter*) 属細菌によるものではない。

尾崎ら、昭和63年度日本醸酵工学会大会講演要旨集P 34には、アルスロバクター(*Arthrobacter*) 属細菌菌体によるD-L-アラニンアミドの、対応するD-アラニンへの酵素的加水分解法が記載されているが、酵素化学の見地からいかなる酵素が関与しているのかについて記載されていない。又、記載されている加水分解反応はアクロモバクター(*Achromobacter*) 属細菌によるものではない。

浅野ら、昭和63年度日本農芸化学会大会講演要旨集P 588；浅野、昭和63年度有機合成

(6)

夏期セミナー「活きた有機合成の手法と新概念」要旨集P 28；浅野、ペトロテック12, 42 (1988) には、未同定細菌より精製したD-アミノ酸アミド加水分解酵素によるD-アミノ酸アミドの、対応するD-アミノ酸への酵素的加水分解法が記載されているが、記載されている加水分解酵素の分子量は122,000であり、本発明の酵素とは、分子量の点で異なる。また、該酵素が作用する基質としてはD-アラニンアミド、D-2-アミノ酪酸アミド、D-セリンアミド、D-スレオニンアミド、D-メチオニンアミド、及びD-ノルバリンアミドのアミノ酸アミド、並びにD-アラニルグリシン、D-アラニル-D-アラニル-D-アラニン、D-アラニル-L-アラニル-L-アラニン、D-アラニル-D-アラニル-D-アラニル-D-アラニン、D-アラニンパラニトロアニリド等のD-アラニン誘導体が言及されているにすぎず、他のアミノ酸誘導体に作用する旨の記載はない。

特公昭61-68には、D-アミノ酸を含むオリゴ

ペプチドに作用する放線菌由来のD-アミノ酸ペプチダーゼの製造法が記されているが、本酵素はペプチドのC末端に作用するカルボキシペプチダーゼ様酵素であって、D-アミノ酸アミドに特異的な加水分解酵素ではない。

従って、アクロモバクター属細菌の菌体処理物によるD-アミノ酸アミドの、対応するD-アミノ酸へのD-立体選択的な加水分解法については、D-アラニンアミド、D-2-アミノ酪酸アミド、D-セリンアミド、D-スレオニンアミド、D-メチオニンアミド、及びD-ノルバリンアミド以外、全く知られていない。

〔発明が解決しようとする課題〕

従って本発明は、今まで存在することが知られていなかった基質特異性および分子量を有するD-アミノ酸アミドに特異的な加水分解酵素、該酵素の新規な製造方法、該酵素を生産する微生物、及び該酵素を利用するD-アミノ酸の新規な製造法を提供しようとするものである。

(7)

〔課題を解決するための手段〕

本発明者等は、該酵素を生産する新規な微生物及び該酵素の新規な製造方法を開発するために、D-アミノ酸誘導体に特異的に作用するアミノ酸アミド加水分解酵素活性を有する菌株を広範囲にスクリーニングしたところ、アクロモバクター属細菌が新規なD-アミノ酸アミド加水分解酵素を生産することを見出した。

前記の目的は、D-アミノ酸誘導体に特異的に作用することを特徴とするアミノ酸アミド加水分解酵素；アミノ酸アミド加水分解酵素を生産する細菌を培養し、この培養物から前記酵素を採取することを特徴とする前記酵素の製造方法；前記酵素又は該酵素の含有物の存在下でD-アミノ酸アミド含有物を反応せしめ、該D-アミノ酸を採取することを特徴とするD-アミノ酸の製造方法；を提供することにより解決される。

以下余白

(9)

(8)

〔具体的な説明〕

(1) 微生物

本発明において使用する微生物としてはD-アミノ酸誘導体に特異的なアミノ酸アミド加水分解酵素を生産できるアクロモバクター(*Achromobacter*)属に属する微生物であればよく、このような微生物は保存菌のなかから選択することができる場合もあり、また自然界から分離することができる。

このような微生物としては、例えば本発明者により分離された新菌株アクロモバクターsp. SCRC-SV3を挙げることができる。この菌株アクロモバクターsp. SCRC-SV3は工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第10608号(PERM P-10608)として寄託されている。

この菌株の分離源は神奈川県相模原市である。

前記の新規な菌株は第1表に示すような菌学的性質を有する。

以下余白

(10)

第 1 表

観 察 項 目	SCRC-SV3の観察結果
a) 形 態	
1 細胞の型	桿 菌
大きさ	0.6 μ m \times 1.2 μ m
2 多形性の有無	-
3 運動性の有無	+
4 胞子の有無	-
5 グラム染色	-
6 抗酸性	-
b) 各培地における生育状態	
1 肉汁寒天平板培養 (30℃, 3日間)	
イ) コロニー形状 (直径)	1 mm
ロ) コロニーの形	円 形
ハ) コロニー表面の形状	平 滑
ニ) コロニーの隆起状態	球 面
ホ) コロニーの周縁	全 縁
ヘ) コロニーの色調	淡ベージュ
ト) コロニーの透明度	不透明

(11)

第 1 表 (続き)

観 察 項 目	SCRC-SV3の観察結果
チ) コロニーの光沢	あ り
リ) 可溶性色素の生成	な し
2 肉汁寒天斜面培養 (30℃, 3日間)	
イ) 生育の良否	良 好
ロ) コロニーの光沢	あ り
3 肉汁液体培養 (30℃, 7日間)	
イ) 表面の生育	良 好
ロ) 濁 度	濁
ハ) 沈 殿	な し
ニ) ガス発生	な し
4 肉汁ゼラチン (30℃, 7日間)	
ゼラチン液化	な し
5 リトマスミルク (30℃, 7日間)	な し

(12)

第 1 表 (続き)

観 察 項 目	SCRC-SV3の観察結果
c) 生理学的性質	
1 硝酸塩の還元	+
2 脱 窒	+
3 M R	-
4 V P	-
5 インドール生成	-
6 硫化水素の生成	-
7 デンプンの加水分解	-
8 クエン酸利用 (Simmons)	+
9 色素生成	
イ) King A培地	-
ロ) King B培地	-
10 ウレアーゼ	-
11 オキシダーゼ	+
12 カタラーゼ	+
13 生育の範囲	
イ) pH	6 ~ 10

(13)

第 1 表 (続き)

観 察 項 目	SCRC-SV3の観察結果
ロ) 温 度	
30℃	+
37℃	+
41℃	-
14 酸素に対する態度	
15 O-Fテスト (グルコース)	酸化的
16 糖類からの酸および ガスの生成	酸 ガス
1. L-アラビノース	- -
2. D-キシロース	- -
3. D-グルコース	+ -
4. D-マンノース	- -
5. D-フラクトース	+ -
6. D-ガラクトース	- -
7. 麦芽糖	+ -
8. ショ糖	- -

(14)

第1表 (続き)

観 察 項 目	SCRC-SV3の観察結果	
	酸	ガス
9. 乳 糖	-	-
10. トレハロース	-	-
11. D-ソルビット	-	-
12. D-マンニット	-	-
13. グリセリン	-	-
14. デンプン	-	-
15. ラフィノース	-	-
16. イヌリン	-	-
17. D-リボース	-	-
18. ソルボース	-	-
19. カルボキシメチルセルロース	-	-
20. グリコーゲン	-	-
17 ビタミン要求性：あり。		
e) その他の諸性質		
DNase	-	
アルギニンの分解	+	
ゼラチンの分解性	-	

(15)

エリッヒア・コリ (*Escherichia coli*) や酵母のごとき異種宿主もしくはアグロモバクテラ属細菌のごとき同種宿主を形質転換することにより、本発明のアミノ酸アミド加水分解酵素生産株を人為的に創製することもできる。

(2) 酵素の製造方法

前記の微生物を培養して本発明のアミノ酸アミド加水分解酵素を製造しようとする場合、基礎栄養培地として、この発明の微生物が増殖し得るものであればいずれを使用してもよい。この培地は、窒素源として例えば硫酸、酵母エキス、ペプトン、肉エキス等の1種類又は複数種類を含有する。また、この培地には必要に応じて炭素源としてグルコース、澱粉、グリセリン等を加えることができる。この培地には無機塩類、例えばリン酸二カリウム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム等を加えることが好ましい。また、酵素の誘導物質となりうる少量のD-アミノ酸アミドを添加することも好ましい。D-アミノ酸アミドの添加量は基礎培地の組成、培養する菌株の性質により異なるが、

(17)

第1表 (続き)

観 察 項 目	SCRC-SV3の観察結果	
	耐塩性	
5 %	+	
7 %	+	
10 %	-	

上記の菌学的性質に基づきチェスターとクーバー (Journal of Clinical Microbiology, 9, 425 (1979)) 及び、Manual of Clinical Microbiology 4th ed., P 330, (1985) の記述に従って、前記 SCRC SV3の菌株を次のように同定した。すなわち、グラム陰性、胞子の生成無し、短桿菌、運動性、好氣的、オキシダーゼ陽性、及びグルコースから酸が生成する。このような性質からアクロモバクテラ属に属する細菌であることが明らかである。

なお、これらの菌株に変異を生じさせて一層生産性の高い菌株を得ることもできる。また、これらの菌株の細胞中に存在するアミノ酸アミド加水分解酵素の生産に関与する遺伝子を切り出し、これを適切なベクター例えばプラスミドに挿入し、このベクターを用いて適当な宿主、例えばエッ

(16)

およそ0.01~5%である。

培養は固体培地又は液体培地のいずれを用いてもよいが、目的酵素を多量に得るためには、液体培地を用い、振盪培養、通気・攪拌培養等により好氣的条件下で培養を行なうのが好ましい。培養温度は菌が生育し、アミノ酸アミド加水分解酵素が生産される温度範囲内であればいずれの温度でも良いが、好ましくは25~45℃である。pHは5~11、好ましくは6~10の範囲である。培養時間は酵素活性が発現される時間を選べば良いが好ましくは6~72時間である。

次に得られた培養物から本発明のアミノ酸アミド加水分解酵素が採取されるが、精製法として通常の酵素精製法を用いることが出来る。遠心分離等によって菌体を集め、超音波処理、ダイノミル等の機械的方法によって菌体を破砕する。細胞片などの固形物を遠心分離などによって除き、粗酵素を得、さらにこれに硫酸プロタミン又は硫酸ストレプトマイシンを加えて処理を行ない、塩析、有機溶媒沈殿、吸着クロマトグラフィー、イオン

(18)

交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を行ない、さらに硫酸アンモニウム等の塩やポリエチレングリコール等の添加による結晶化等の公知の方法によって均一の結晶酵素標品を単離することが出来る。

この方法において使用されるアミノ酸アミド加水分解酵素の使用形態は特に限定されない。例えば、精製された酵素を使用することができるのは無論のこと、細胞を含有する培養液、培養生菌体、アセトン等によって脱水処理された風乾菌体、菌体破砕物、種々の段階まで精製された部分精製物を使用することが出来る。さらにこれらの酵素または酵素含有物をポリアクリルアミド、光架橋性樹脂、ポリウレタン樹脂、カップカラギーナン、アルギン酸ナトリウム、イオン交換樹脂、半透膜、高分子酵素修飾剤等により固定化したものを使用することが出来る。

(3) 力価の測定法

本発明においては次の方法により力価を測定し

た。トリス塩酸緩衝液 (pH8.5) 50 μmol 、D-フェニルアラニンアミド 5 μmol 、及び適量の酵素サンプルを 0.5 ml になるように混合し、30℃において10分間反応せしめた後、沸騰水中に3分間浸して反応を停止し、生成したD-フェニルアラニンを以下の方法によって定量した。すなわち、上記反応液 0.5 ml に、フェノール 10.6 μmol 、4-アミノアンチピリン 0.79 μmol 、パーオキシダーゼ 5 単位を加えて、1.5 ml とし、30℃において5分間保温した後、D-アミノ酸オキシダーゼを 0.14 単位加えて 1.6 ml とし、37℃において60分間振盪した。これを沸騰水中に3分間浸して反応を停止し、500nm における吸収を測定して、検量線より反応液中のD-フェニルアラニン量を求めた。また、他のD-及びL-アミノ酸アミドに対する本酵素の活性は、生成するアンモニアを定量キット (協和メデックス社製) を用いて測定して求めた。1分間当り 1 μmol のD-フェニルアラニンを生成する酵素量を1単位とした。

(19)

(20)

(4) 酵素の性質

本発明のアミノ酸アミド加水分解酵素は次の性質を有する。

(1) 作用: 次式に示す反応を触媒する。



(2) 基質特異性: 本酵素は、D-トリプトファンアミド、D-フェニルアラニンアミド、D-チロシンアミド等の芳香族D-アミノ酸アミド、及びその他の比較的疎水性の高いD-アミノ酸アミドを良好な基質とする。具体的には第2表の通りである。

以下余E

第 2 表

基 質 ア ミ ド	相対活性 (%)
D-フェニルアラニンアミド	100
D-トリプトファンアミド	96
D-チロシンアミド	97
D-ロイシンアミド	46
D-アラニンアミド	33
D-メチオニンアミド	28
D-ノルロイシンアミド	40
D-ノルバリンアミド	15
D-フェニルグリシンアミド	15
D-バラヒドロキシフェニル グリシンアミド	15
D-プロリンアミド	9.7
D-リジンアミド	2.5
D-ヒスチジンアミド	1.5
D-アスパラギン酸アミド	1.4
D-グルタミンアミド	1.1
D-スレオニンアミド	0.64
グリシンアミド	0.57

(21)

(22)

第2表 (続き)

基 質 ア ミ ド	相 対 活 性 (%)
D-グルタミン酸アミド	0.27
D-アスパラギンアミド	0.25
D- α -アミノ酪酸アミド	0.18
D-イソグルタミン酸アミド	0.10
D-アルギニンアミド	0.09
D-バリンアミド	0.15
D-イソロイシンアミド	0.11
D-フェニルアラニンメチル エステル	192

これらに対応するL-アミノ酸アミドには作用しない。

(3) 至適pH: pH8付近が至適である。

(4) pH安定性: 各pHの緩衝液(0.05M)中、30℃にて1時間保温した後の残存活性を測定した場合、pH7.0~10.0付近が安定である。

(5) 至適温度: 40℃付近における活性が最大である。

(23)

D-アミノ酸アミド含有物からD-アミノ酸を合成する方法は、以下のごとくに行われる。本発明に用いられるD-アミノ酸アミド含有物は、例えば、公知の方法に従ってそれぞれのD-アミノ酸メチルエステル含有物を合成し、続いて、アンモニアガスと反応せしめるか、あるいは、ストレッカー法により合成した α -アミノニトリルを化学的あるいは酵素的に水和して得ることができる。また、D-アミノ酸アミドの酵素による光学分割の際に副生するD-アミノ酸アミドを用いることもできる。本発明に用いる酵素としては、アミノ酸アミド加水分解酵素、アミダーゼ、アミノペプチダーゼ、アシラーゼ等いずれの通称名で呼ばれるものでも良いが、N末端が遊離のD-アミノ酸アミドに対してD立体特異的に作用してD-アミノ酸を生成する加水分解酵素であれば良い。具体的には、本発明のアミノ酸アミド加水分解酵素を挙げることができる。

アミノ酸アミド加水分解酵素反応によるD-アミノ酸の製造の様態については、特に制限はない

(25)

(6) 温度安定性: 0.1Mリン緩衝液(pH8.0)中、各温度において10分間処理した後の残存活性を測定したところ、35℃で85%の活性が残存していた。

(7) 吸収スペクトル: 278nmに極大吸収を有する。

(8) 金属イオン、阻害剤の影響: 亜鉛、水銀等の金属イオン及びPHSP等の阻害剤によって活性が阻害される。

(9) 等電点: アンホラインを用いる焦点電気泳動により測定した場合、約5.3である。

(10) 分子量: 高速液体クロマトグラフィー(TSK 3000 SW)により約38,000と算出される。

(11) 均一性: 高速液体クロマトグラフィー(TSK DEAE 5PW)により第1図Aに示す如く単一のピークを与える。また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により第1図Bに示す如く単一のバンドを与える。

(5) D-アミノ酸の製造法

新規なアミノ酸アミド加水分解酵素を用いて、

(24)

が、通常は前記の酵素を含む反応液に基質としてのD-アミノ酸アミド、及び水が含まれていれば反応が進行する。

酵素の様態としては、特に制限はないが、細胞を含有する培養液、培養菌体、酵素源を含む処理物、培養上清液、又は培養液から分離した菌体の処理物、これから得た酵素剤、さらに、これらの酵素又は、酵素含有物を常法によって固定化したもの等、酵素反応手段として実施される方法であれば反応に供することができる。工業的な実施にあたっては、生菌体、固定化菌体等を用いるのが有利である。反応液中のアミノ酸アミド加水分解酵素の量は基質であるD-アミノ酸アミドの量等によって異なり、特に限定されないが、通常1~100,000単位とするのが便利である。

原料のD-アミノ酸アミドの濃度は反応を阻害しない程度であれば良く、反応液中の前記酵素の濃度等により異なり特に限定されないが、1~500g/lとするのが便利である。低濃度で使用する場合には遊離塩基の形で使用することができる

(26)

るが、比較的高濃度で使用する場合には例えば、塩酸塩やトリル酸塩等の形で使用するのがpH調整の観点から好ましい。D-アミノ酸アミド含有物又はその塩はパッチ式反応においては反応開始時に一度に添加することもでき、又反応の進行と共に複数回に分割して、もしくは連続的に添加することもできる。

反応媒体としては、水、又はアセトン、アセトニトリル、DMSOもしくはDMF等を含む緩衝作用を有する水溶液を用いることができる。緩衝液としては、例えば、トリス-HCl緩衝液、リン酸緩衝液、イミダゾール-HCl緩衝液、HEPES-NaOH緩衝液、TRICINE-NaOH緩衝液、炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液、ホウ酸-NaOH緩衝液等を使用することができる。また、ケトン、エーテル、炭化水素、芳香族オレフィン、ハロゲン化炭化水素、有機酸エステル、アルコール、ニトリル等水と混合しない有機溶媒をも用いることもできる。例えば、メチルブチルケトン、イソプロピルエーテル、石油エーテル、ヘキサン、ヘプタン、

シクロヘキサン、四塩化炭素、クロロフォルム、二塩化メチレン、トリクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、酢酸エチル、酢酸ブチル、ブタノール、ヘキサノール、オクタノール等を水と共存させて使用することができる。また、それらの有機溶媒の混合物を使うこともできるし、水を飽和させた有機溶媒、水性緩衝液との二層系あるいは、ミセル、逆ミセル、エマルジョンとして反応させることもできる。

反応のpHとしては、pH5~11、好ましくはpH6~10とする。

反応の温度も反応のpHと同様に考えることができるが、通常は20~60℃、好ましくは25~50℃である。

反応時間は、特に限定されないが、反応混合物の基質濃度、酵素力価等、に依存して基質D-アミノ酸アミド含有物が十分な収率でD-アミノ酸に転換されるまで反応を維持する。

生成したD-アミノ酸は任意に常法によって精製採取することができる。例えば、反応終了後に、

(27)

トリクロロ酢酸を加えて蛋白質を沈澱せしめ、菌体（存在する場合には）と共に濾過し、濾液をイオン交換樹脂等により精製し、結晶化する。

次に実施例によりこの発明をさらに具体的に説明する。

実施例1 アクロモバクター_{sp.} SCRC-SV3からのD-アミノ酸アミダーゼの精製

グルコース0.1%、トリプトン0.5%、酵母エキス0.5%、及びK₂HPO₄ 0.1%を含有し、pH7.0に調整した培地10ℓを120℃、15分間加熱殺菌した後、アクロモバクター_{sp.} SCRC-SV3（微生物研寄第10608号）を接種して24時間培養の後、菌体を得た。

菌体を生理的食塩水で洗浄した後、0.1mM EDTA及び5mM 2-メルカプトエタノールを含むリン酸緩衝液（pH7.0）300mlに懸濁し、9kHzにおける超音波処理を約20分（計約2.5時間）行ない菌体を破碎した。破碎菌体は14,000×g、20分間の遠心分離で除去し、D-アミノ酸アミダーゼを含む素抽出液を得た。この無細胞抽出液にプロ

(29)

(28)

タミン硫酸を3.8g加えて、30分攪拌した後、14,000×g、20分間の遠心分離で沈澱を除去した。この上清に固形硫酸アンモニウムを加え60%硫酸アンモニウムと飽和した。30分攪拌の後、14,000×gで20分間の遠心分離で得られる、酵素活性を有する沈澱を少量の0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）で溶解し、さらに0.1mMのEDTA及び5mMの2-メルカプトエタノールを含む0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）で透析した。この酵素液をあらかじめ0.1mMのEDTA及び5mMの2-メルカプトエタノールを含む0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化したDEAE-トヨパール 650Mのカラムに通過させ、0.1mMのEDTA、5mMの2-メルカプトエタノール、及び0.1MのNaClを含む0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）で溶出した。

活性区分を集め、DEAE-トヨパール 650Mのカラムクロマトグラフィーのステップを繰り返した。活性区分を集め、0.1mMのEDTA及び5mMの2-メルカプトエタノールを含む0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）で透析後、あらかじめ同じ緩衝液で平

(30)

第 3 表

工 程	総活性 (単位)	総蛋白 (mg)	比 活 性 (単位/mg)
1. 無細胞抽出液	1,820	19,000	0.0960
2. プロタミン処理及び 硫酸分画 (0-60%)	1,480	14,800	0.0960
3. DEAE-トヨパール (1回目)	950	350	2.71
4. DEAE-トヨパール (2回目)	752	144	5.23
5. ヒドロキシアパタイト	575	38.5	14.9
6. セファデックス G-200	293	16.1	18.2
7. TSK G-300SW	96.2	4.0	24.1
8. TSK DEAE 5PW	54.0	0.11	482

平衡化したヒドロキシアパタイトのカラムに通過させ、0.1 mMのEDTA及び5 mMの2-メルカプトエタノールを含む0.01 Mから0.5 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。この活性区分を集め、0.1 mMのEDTA及び5 mMの2-メルカプトエタノールを含む0.01 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で透析後、濃縮し、0.1 mMのEDTA及び5 mMの2-メルカプトエタノール及び0.1 M NaClを含む0.05 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したセファデックス G-200 によるゲル濾過クロマトグラフィーを行なった。次に、同上の緩衝液を用いて、TSK G3000 SWゲル濾過カラムを用いる高速液体クロマトグラフィーを行なった。さらに、活性区分をTSK DEAE-トヨパールイオン交換カラムを用いる高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.2 ~ 0.3 Mのトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) の濃度勾配で溶出させた。こうして、アミノペプチダーゼを約 5,000倍に精製した。この精製工程における比活性及び回収率を第3表に示す。

この酵素はPhenyl-5PW カラムクロマトグラフィーにより単一のピークを与え (第1図)、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において均一であることが証明された (第2図)。

(31)

(32)

実施例 2. アクロモバクター sp. SCRC-SV3 の部分

精製酵素による D-フェニルアラニン
アミドからの D-フェニルアラニン
の合成

D-フェニルアラニンアミド塩酸塩 1.50 g (0.0075 mol) を 0.2 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) 75 ml に溶解し、0.01 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) で透析したアミノペプチダーゼ 210 単位 (実施例 1 において部分精製した比活性 14.9 単位/mg の酵素) を加えて、37℃で1時間保温した。反応液中に生成した D-フェニルアラニンをアンバーライト IRA-400 (C₁₈) カラムに吸着させ、水洗後、1 N塩酸で溶出させた。この溶液を減圧下濃縮し、Dowex 50W×8 (H⁺) カラムに吸着させ、水洗後、1 Nアンモニア水で溶出させた。減圧下濃縮し、D-フェニルアラニンを 581 mg (47.0%) 得た。得られた D-フェニルアラニンは水-メタノール-イソプロピルアルコール-エーテルで再結晶し、市販の D-フェニルアラニンとスペクトルデータを比較した。融点: 270℃。

(33)

元素分析値

計算値 (%)	実測値 (%)
C 65.43	65.32
H 6.71	6.71
N 8.48	8.48

$[\alpha]_D^{20} + 35.5^\circ$ ($c = 0.48$, H₂O) で光学的に純粋な D 体であった。マススペクトル、核磁気共鳴スペクトル、および赤外吸収スペクトルによる分析結果はいずれも、生成物が D-フェニルアラニンであることを示した。

4. 図面の簡単な説明

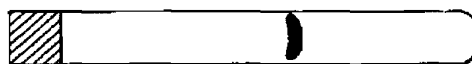
第1図は、本発明の精製酵素の Phenyl-5PW カラムクロマトグラフィーの溶出プロファイルを示し、本発明の酵素が均一であることを示す。

第2図は本発明の精製酵素のポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果をスケッチしたものであり、本発明の酵素が均一であることを示す。

(34)



第 1 図



第 2 図

第 1 頁の続き

⑥Int. Cl. ⁵			識別記号	庁内整理番号
// C 12 N	1/20		A	8515-4B
(C 12 N	9/80			
(C 12 R	1:025)			
(C 12 P	13/04			
(C 12 R	1:025)			
(C 12 P	13/22			
(C 12 R	1:025)			
(C 12 N	1/20			
G 12 R	1:025)			